

4. Diskussion

4.1 Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, zwei chemisch sehr unterschiedliche Magnetresonanz-(MR-)Kontrastmittel der Firma Schering, die sich gegenüber atherosklerotischer Läsionen stark affin verhalten und diese in MRT-Untersuchungen signalreich darzustellen vermögen, histologisch zu detektieren und zu lokalisieren, um die Mechanismen der Anreicherung in atherosklerotischen Gefäßwänden zu verstehen. Die bestehende Hypothese, dass sich die Kontrastmittel mit Hilfe von migrierenden Monozyten als phagozytierte Partikel in atherosklerotischen Läsionen anreichern, sollte insbesondere geprüft werden.

Die Kontrastmittel wurden in Aortenschnitten von Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) Kaninchen zu zwei Zeitpunkten zunächst im Magnetresonanztomographen (MRT) und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Versuch1).

Im weiteren (Versuch 2) wurden beide Kontrastmittel im Vergleich zu einem partikulären, eisenoxidhaltigen Kontrastmittel auf ihr Anreicherungsverhalten in vitro untersucht. Dieses Experiment diente zur weiteren Klärung der Anreicherungsmechanismen und der Etablierung eines In-vitro-Modells, welches für Untersuchungen an humanem Material in einer weiterführenden Arbeit entwickelt werden soll. Die Anreicherung der drei Kontrastmittel wurde fluoreszenzmikroskopisch, bzw. mittels histochemischen Nachweises zeitabhängig an isolierten Kaninchenaortenringen untersucht.

4.2 Die Eignung der Atherosklerose des WHHL-Kaninchens als Tiermodell

WHHL-Kaninchen sind als Tiermodell in sofern geeignet, als dass WHHL-Kaninchen im Alter von 3 Monaten zuverlässig Atherosklerose entwickeln (ATKINSON et al 1989). Seit dem Bestehen der Zuchtlinie hat das WHHL-Kaninchen als Atherosklerosemodell zur Atheroskleroseforschung viel beigetragen: GOLDSTEIN und BROWN gewannen 1985 den Nobelpreis für Medizin aufgrund ihrer Studien zum Cholesterin-Metabolismus mit Hilfe des WHHL-Kaninchen.

Dennoch ist das WHHL-Kaninchen als Tiermodell für Atherosklerose umstritten, da WHHL-Kaninchen hauptsächlich stabilere Plaques entwickeln, die keine oder nur eine geringe Neigung zur Plaqueruptur besitzen; sie gelten deshalb als ungefährlicher als menschliche Plaques (WILLERSON et al 1989; SHAH und FORRESTER 1991; FUSTER et al 1992 und 1994; DEMER et al 1994).

Da die Atherosklerose beim WHHL-Kaninchen wie beim Menschen u.a. durch einen pathologisch erhöhten Cholesterinspiegel des Blutes initiiert wird, in der Atherogenese also ähnelt, gilt das

WHHL-Kaninchen als etabliertes Tiermodell für die Atherosklerose (WATANABE et al 1985). Auch die eigenen histologischen Untersuchungen und die von ATKINSON et al (1989) befinden das WHHL-Kaninchen als Tiermodell für Atherosklerose für die vorliegenden Untersuchungen als geeignet.

Für die Fragestellungen dieser Arbeit stand die mögliche Diagnostik früherer Plaquestadien und nicht vulnerable Plaques mit Ruptur im Vordergrund. Einfache Handhabung und einen Aortendurchmesser, der den menschlichen Koronarien oder Karotiden gleicht, sprachen für die Verwendung des WHHL-Kaninchens als Atherosklerosemodell.

4.2.1 Vergleich mit Plaquebildung beim Menschen

WILLERSON et al 1989; SHAH und FORRESTER 1991; FUSTER et al 1992 und 1994; DEMER et al 1994 sahen folgende Unterschiede im Plaqueaufbau zwischen Menschen und WHHL-Kaninchen:

1. Die Plaques von WHHL-Kaninchen enthalten im Vergleich zum Menschen weniger Entzündungszellen,
2. in der Tiefe der Plaques befindet sich kein dem Menschen vergleichbares Lipid Core,
3. die fibröse Kappe ist beim WHHL-Kaninchen dicker, wodurch die Plaques stabilisiert werden,
4. die Lipide besitzen ein unterschiedliches Fettsäuremuster, so dass sie beim WHHL-Kaninchen im festen Zustand vorliegen und beim Menschen zahnpastartige Konsistenz besitzen,
5. die atherosklerotischen Läsionen der Kaninchen weisen nur selten und im geringen Ausmaß Verkalkungen auf.

Die beschriebenen Unterschiede zwischen WHHL-Kaninchen und Menschen konnten in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Das WHHL-Kaninchen wurde dennoch als Tiermodell ausgewählt, da eine Vulnerabilität der Plaques nicht im Vordergrund der Untersuchung stand und der Aortendurchmesser ausreichend dimensioniert für das MRT-Auflösungsvermögen ist.

4.2.2 Charakterisierung und Einteilung der Plaques

In den eigenen Untersuchungen konnten hierzu folgende Ergebnisse gefunden werden: Das fibrous Cap war in vielen Läsionen sehr dick. Zellarme fibrotische Läsionen (Stadium 6) wurden bei einem Viertel der Aortenbogenteilstücke beobachtet (rund 23%). Alle anderen Läsionen (rund 77%) zeigten jedoch einen hohen Anteil an Zellen des Monozytären Phagozytensystems (MPS). Verkalkungen waren nur selten anzufinden. Lipidseen unterschiedlicher Größe wurden regelmäßig

in Aortenteilstücken beobachtet, die dem Stadium 5 zugeordnet wurden (35 %). Aufgrund dieser Ergebnisse konnten die Plaques der WHHL-Kaninchen nicht in bestehende Schemata, die auf Grundlage von Untersuchungen menschlicher Plaques entstanden (VIRMANI et al 2000; STARY 2000b) eingeteilt werden. Es war ein eigenes Schema zur Charakterisierung der WHHL-Plaques erforderlich.

4.3 Zu Ergebnissen der In-vivo-Aplikation von Gadophrin-2 und Gadofluorine-M (Versuch1)

4.3.1 MRT

Beide Kontrastmittel wurden in vivo auf ihre Signalintensität 24 und 48 Stunden nach Applikation im MRT untersucht. Als Ausgangswert (Baseline) dienen MRT-Bilder von vier WHHL-Kaninchen vor Kontrastmittelverabreichung. Bei Gadophrin-2 konnten 24h p.i. bessere Signalintensitäten beobachtet werden, bei Gadofluorine-M wurde zu beiden Zeitpunkten eine gute Signalintensität erreicht, wobei 48h p.i. aufgrund der günstigeren Kontrastverhältnisse zwischen Blut und Gefäßwand eine bessere Bilddarstellung im MRT gelang. Die Intensität war deutlich abhängig von der Bluthalbwertszeit, die bei Gadophrin-2 bis 2,2 h und bei Gadofluorine-M 10 h beträgt: Aufgrund der langen Bluthalbwertszeit von Gadofluorine-M war der Kontrastmittelgehalt im Blut lange nach Verabreichung hoch, so dass sich das Gefäßlumen sich 24h p.i. noch sehr signalreich darstellte und keine Abgrenzung zur ebenfalls signalreichen Gefäßwand erlaubte.

4.3.2 Fluoreszenz

Zur histologischen Detektion der inkorporierten Substanzen wurde das Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie ausgewählt. Das Kontrastmittel Gadophrin-2 besitzt aufgrund eines Porphyrinringes im Molekül Autofluoreszenz (NI et al 2002; DALDRUP-LINK et al 2004), Gadofluorine-M musste zur Lokalisierung im Fluoreszenzmikroskop erst mit dem speziellen Fluoreszenzfarbstoff Perfluoralkylindocarbocyanin (siehe Strukturformel auf S.31 Abb.3) im Verhältnis 1:100 markiert werden, welcher sich in die von den Gadofluorine-M-Molekülen gebildeten Mizellen aufgrund der Perfluorkette integriert. Das Verhalten dieser Mizellen im Organismus und dessen Grenzmembranen ist unbekannt. Die Anreicherung des Kontrastmittels (Beweis MRT-Signal), als auch des Farbstoffes in der Plaque (Beweis Fluoreszenzsignal) deuteten auf eine Funktionsfähigkeit der Mizelle als transportierendes Vehikel auch im Organismus mit seinen Grenzmembranen hin, zumal in Vorversuchen keine Plaqueanreicherung des Farbstoffes nach alleiniger Applikation in gleicher Konzentration beobachtet werden konnte. Ob die Farbstoffmoleküle innerhalb der Plaque neben einzelnen Gadofluorine-M-Molekülen isoliert, neben Gadofluorine-M-Mizellen isoliert oder innerhalb von Gadofluorine-M-Mizellen integriert vorliegen, ist bisher ungeklärt.

4.3.2.1 Intensität

Zur Bestimmung der Fluoreszenzsignalintensität gelangten ausschließlich native Kryoschnitte, um ein Herauslösen der Kontrastmittelmoleküle aus den Schnittpräparaten in Folge von Fixationsprozessen zu vermeiden. Die Intensitäten der Kontrastmittel in den Plaques wurden vergleichend und zeitabhängig zu den Zeitpunkten 24h und 48h p.i. untersucht. Hierbei zeigte Gadophrin-2 ein deutlich stärkeres Signal zum Zeitpunkt 24h p.i., 48h p.i. war nur noch bei einem Drittel der untersuchten Aortenteilstücke ein gutes Fluoreszenzsignal zu beobachten.

Die Fluoreszenzintensität von Gadofluorine-M zeigte zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten augenscheinlich keine signifikanten Unterschiede.

Die Fluoreszenzsignalabnahme von Gadophrin-2 nach 48h ist vermutlich auf eine kürzere Bluthalbwertszeit (2 - 2,2 h) als von Gadofluorine-M (10 h) zurückzuführen, Gadophrin-2 diffundiert vermutlich aufgrund des entstehenden Konzentrationsgefälles aus der Plaque in das Blut zurück.

4.3.2.2 Lokalisation

Da sich die Lokalisation der Fluoreszenz durch die Hellfeld-Mikroskopie nativer Kryoschnitte aufgrund mangelnder Zellfärbung schwierig gestaltete und sich atherosklerotische Läsionen sehr vielgestaltig darstellen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der Serienschnittuntersuchung gewählt. Die Aortenteilstücke wurden hierzu mit Hilfe histologisch und immunhistologisch gefärbter Serienschnitte charakterisiert und auf eine Kolo-kalisationen mit der Fluoreszenz in einem weiteren zugehörigen Serienschnitt untersucht. Nachteil dieser Methode ist, dass Schnitt 1 einige μm vom letzten Schnitt entfernt ist, die Schnitte also geringfügig voneinander im Zellbild abweichen können. Die Genauigkeit der Untersuchungsmethode reichte dennoch zur Lokalisation der Kontrastmittel in Kompartimenten der Plaques aus, da das Fluoreszenzsignal insgesamt eher flächig als punktuell auftrat.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich beide Gd-haltigen KM innerhalb der atherosklerotische Läsionen anreichern, die Untersuchungen zur histologischen Lokalisation zeigten allerdings zwei unterschiedliche Ergebnisse: Während sich Gadophrin-2 sowohl in Gebieten mit hoher Anzahl von Zellen des MPS als auch in zellarmen, fettigen und extrazellulären (Mf) Arealen wiederfand, konnte Gadofluorine-M vorwiegend in der Mf detektiert werden (siehe Tabelle 14). Zellreiche Gebiete wurden von Gadofluorine-M meist eindeutig ausgespart. Bei beiden KM-Gruppen konnte eine Tendenz beobachtet werden, dass sich zum Untersuchungszeitpunkt 48h etwas häufiger eine Kolo-kalisation zwischen MPS-positiven Zellen und Fluoreszenz zeigte als bei 24h. Bei Gruppe 2 (Gadophrin-2 48h) konnte bei einem Drittel der Aortenteilstücke eine ausschließliche Anreicherung in Zellen des MPS beobachtet werden.

Um die Anreicherung beider Kontrastmittel vergleichend zu betrachten, wurden die in der Tabelle

14 (Seite 85) aufgeführten Ergebnisse als Basis zur Diskussion hier noch einmal graphisch dargestellt. Der Grafik in Abb.37 kann entnommen werden, dass es für das MPS-Kompartiment Unterschiede zwischen Gadofluorine-M und Gadophrin-2 gibt, die nach statistischem Test auch signifikant sind (Unterschied der Mittelwerte). Für Mf konnte kein signifikanter Unterschied (Zusammenfallen der Mittelwerte) festgestellt werden.

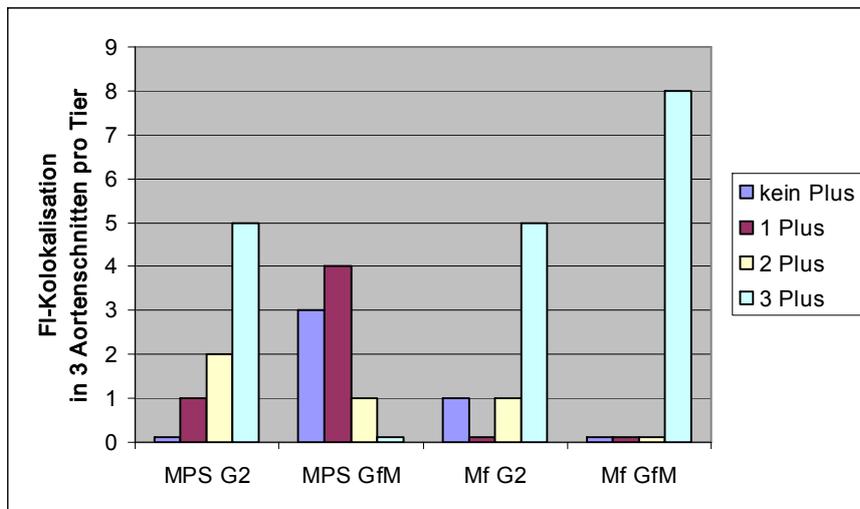


Abb.37: Die Abbildung zeigt die Fluoreszenz-Kolokalisation in Zellen des MPS und in der fettigen Matrix (Mf) in den Histoschnitten dreier Aortenbogenteilstücken pro Tier. Bei Gadophrin 2 wurden bei fünf von acht WHHL-Kaninchen drei Plus (maximale Punktzahl, lindgrüner Balken) vergeben für eine Anreicherung im MPS als auch in der Mf. Bei Gadofluorine-M wurden bei allen Tieren drei Plus für eine Anreicherung in der Mf vergeben, im MPS wurden lediglich ein bis zwei Plus verteilt, eine Anreicherung im MPS war nicht signifikant. Ersichtlich ist weiterhin, dass es im Vergleich beider Kontrastmittel untereinander zwar einen Unterschied in der MPS Anreicherung gab (G2>>GfM), aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrastmitteln bei der Mf Anreicherung feststellbar war. (Null wurde zur Sichtbarmachung mit 0,1 als kleinster Balken ersetzt.)

Wie die Grafik der Abb.37 zeigten bereits auch die Ergebnisse, dass Gadofluorine-M im Gegensatz zu Gadophrin-2 keine besondere Makrophagen- oder Monozytenaffinität besaß. Beide Kontrastmittel hatten eine hohe Affinität zur fettigen Matrix.

Die bisher bekannten, auf Gadolinium basierenden KM sind dafür bekannt, sich im extrazellulären Raum zu verteilen (WASSERMANN et al 2002). Die Anreicherung der untersuchten Gd-haltigen KM innerhalb atherosklerotischer Gefäßwände kann auf die erhöhte Endothelpermeabilität und/oder den erweiterten Extrazellulärräumen der Intima bei atherosklerotischen Geschehnissen zurückzuführen sein. Das entzündliche Ödem und die große Menge extrazellulärer Fasern, Lipide und Nekrosen führen zu einem sehr geringen, zellulären Zusammenhalt, so dass sich die

Substanzen, erst einmal hineingelangt, innerhalb der Plaque frei verteilen können. Verschiedene ergänzende Untersuchungen zeigten zudem ein längeres Verweilen von Gadofluorine-M im Blut bei WHHL-Kaninchen als in Weißen Neuseeländer- (WN-) Kaninchen, ein Zusammenhang mit dem hohen Blutfettspiegel der WHHL-Kaninchen ist anzunehmen. Eventuell liegen die Gadofluorine-M-Mizellen im Blut an Lipoproteine gebunden vor und werden in die Gefäßwand mitgenommen, wo sich LDL in großen Mengen ablagern. Eigene Untersuchungen hierzu mit Apolipoprotein-B 100-Antikörperfärbungen konnten diese Theorie allerdings bislang nicht bestätigen, da eine Kolokalisation histologisch nicht nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der Zunahme an Kolokalisationen mit Zellen des MPS nach 48 Stunden, muss an eine sekundäre, physiologische Phagozytose der Kontrastmittel als solche oder zusammen mit der fettigen Matrix durch Makrophagen gedacht werden.

In den sogenannten Lipidseen wurde kein KM vorgefunden. Dieser Raum scheint den Substanzen nicht zugänglich zu sein. Eventuell ist das auf die straffe Faseranordnung, die sich rund herum befindet, zurückzuführen. Die Faserbildung diene im Prozess der Atherogenese der Stabilisierung und Abschirmung der massiven Schaumzellapoptose in der Tiefe.

4.3.2.3 Phagozytose

Als Nachweis für plaqueständige Monozyten und Makrophagen wurden in der Immunhistochemie die Primärantikörper CD14 und CD68 verwendet. CD14 (Monozyten Klon TÜK 4) reagiert mit einem Antigen, welches hauptsächlich auf Monozyten vorkommt, so dass sich in die Plaque migrierte, aber noch nicht in Makrophagen differenzierte Monozyten anfärben sollten. Wenn laut Hypothese (MISSELWITZ 1999) die blutständigen Monozyten als Vehikel für die Plaqueanreicherung der Kontrastmittel Gadophrin-2 und Gadofluorine-M verantwortlich wären, so müssten vor allem zum früheren Untersuchungszeitpunkt 24h p.i. lumennahe, CD14-positive Areale in der Plaque fluoreszieren. Da aber keine besondere Korrelation zwischen CD14-positiven und fluoreszierenden Bereichen beobachtet werden konnte, kann diese Hypothese nicht bestätigt werden: Monozyten sind nicht an der Anreicherung der Kontrastmittel als phagozytierte Moleküle in den Plaques beteiligt.

CD68 (Makrophagen, Klon EMB11) färbt Makrophagen in Kryoschnitten an (nach Empfehlung von Dako Cytomation zeigen Kaninchen-Makrophagen eine starke Reaktion mit dem Klon EMB11). Da alle Makrophagen als Monozyten in die Plaque imigrierten, und sich erst dann zu gewebsständigen Makrophagen ausdifferenzierten, ist der Übergang von Monozyt zur Makrophage allerdings fließend. Bei CD68-positiven Zellen kann von Makrophagen mit starker Phagozytoseaktivität ausgegangen werden, so dass bei einer Korrelation zwischen CD68-positiven und fluoreszierenden Bereichen eine, zusätzlich zur extrazellulären, intrazelluläre Kontrastmittelanreicherung durch phagozytotische Aktivität diskutiert werden kann.

Bei Untersuchungen von WEISSLEDER et al (1990) und SCHMITZ et al (2001) konnten bei dem Kontrastmittel SHU 555C eine Anreicherung in Geweben mittels Monozytenmigration beobachtet werden: In atherosklerotischen Läsionen enthielten ausschließlich die lumennahen Monozyten zytoplasmatisch Eisenoxidpartikel, andere Plaquestrukturen waren frei von Eisen (SCHMITZ et al 2001). Auch in eigenen histologischen Untersuchungen wurden 72 h p.i. intrazelluläre Eisenoxidpartikel in Makrophagen vorgefunden; in Plaques von Tieren, die acht Wochen zuvor mit SHU 555C behandelt wurden, befanden sich Eisenoxidpartikel extrazellulär in der Tiefe von Plaques im Schaumzellebris. In nach Quincke gefärbten Blutaussstrichen von Tieren, denen 24h und 48h zuvor Kontrastmittel verabreicht wurden, konnten intrazelluläre Eisenoxidpartikel in Leukozyten gefunden werden, Gadophrin-2 und Gadofluorine-M befanden sich extrazellulär. SHU 555C reichert sich also im Gegensatz zu Gadophrin-2 und Gadofluorine-M per Monozytenmigration in der Plaque an.

4.3.2.4 Korrelation MRT-Fluoreszenz

Zur Verbesserung des Kontrasts sollte das Blutsignal durch Unterdrückung reduziert werden. Deshalb verwendet man eine Inversion-recovery-turboflash-Sequenz, bei der bei bestimmten Konzentrationen der Kontrastmittel kein MRT-Signal gesendet wird. Das hatte zur Folge, dass in einer gewissen Konzentration kein lineares Verhältnis zwischen Kontrastmittel-Konzentration und MRT-Signal herrschte.

Ein Rückschluss vom MRT-Signal auf die Plaquekonzentration eines Kontrastmittels kann aufgrund der Ergebnisse, in denen sich eine Korrelation zwischen MRT- und Fluoreszenz-Signalintensität abzeichnete, gezogen werden.

4.4 Zu Ergebnissen der In-vitro-Inkubation (Versuch 2)

Ein praktikables In-vitro-Modell ist zur weiteren Forschung zur Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen wichtig. Indem weitergehende Untersuchungen direkt an humanem Material, z.B. durch Endarterioektomie gewonnene, kranke Karotiden, durchgeführt werden, könnte das Verhalten der Kontrastmittel in humanen Plaques beobachtet werden und auf Versuchstiere z.T. verzichtet werden. Auch zum Verständnis der Anreicherungsmechanismen sind die Untersuchungen im zweiten Versuchsteil zur Etablierung eines In-vitro-Modells von Nutzen. In den Untersuchungen zeichnete sich folgender Perfusionsmechanismus ab: Gadophrin-2 war in vitro in der Lage, sich bereits nach 5 minütiger Inkubation isolierter Aortenringe extrazellulär auf gleiche Weise wie in vivo anzureichern. Im Gegensatz hierzu reicherte sich Gadofluorine-M im In-vitro-Versuch erst sehr spät und nur im subendothelialen Drittel an, also nicht vergleichbar mit der In-vivo-Anreicherung. Das eisenoxidhaltige Kontrastmittel (USPIO) vermochte sich hingegen gar nicht anzureichern, es befand sich auch nach 120 Minuten lediglich an einigen Stellen intra-endothelial.

Eine Anreicherung in der ebenfalls Kontrastmittel-exponierten Adventitia erfolgte nicht.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann auf einen unterschiedlichen Anreicherungsmechanismus aller Kontrastmittel in atherosklerotischen Läsionen geschlossen werden; während das molekulare Gadophrin-2 scheinbar unspezifisch in die atherosklerotischen Läsionen diffundiert, müssen bei dem großen mizellar vorliegenden Gadofluorine-M aktive Prozesse, welche vitale Verhältnisse voraussetzen, an der Anreicherung in der Plaque beteiligt sein. Auch LDL gelangt aktiv durch transzellulären Transport per rezeptorvermittelter Endozytose in die Plaque. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass Gadofluorine-M wie Gadophrin prinzipiell per Diffusion in die Plaque gelangt, hierfür nur aufgrund seiner Größe mehr Zeit als Gadophrin benötigt. USPIOs sind für ihre zelluläre Anreicherung bekannt, so dass es nicht verwunderlich war, dass sie sich nicht im In-vitro-Modell anreicherten.

Die Gadophrin-2-Anreicherung erfolgte nur von der luminalen Seite her, denn die ebenfalls dem Kontrastmittel exprimierte adventitielle Gefäßseite zeigte nur vereinzelt Fluoreszenz, fungiert also vermutlich auch in vivo nicht als Eintrittspforte.

Mit den Ergebnissen dieser ersten In-vitro-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in vitro alle drei Kontrastmittel ein unterschiedliches Anreicherungsverhalten besitzen und die In-vitro-Untersuchung von Kontrastmitteln an humanem Material grundsätzlich möglich sind.

In dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse sollen anregen, weitergehende Untersuchungen zur Methodik, insbesondere zur Temperatur-, Zeit- und Nährmediumabhängigkeit, aber auch zur Phagozytose durchzuführen.

4.5 Diagnostische Möglichkeiten und humanmedizinische Bedeutung

Atherosklerose ist die meist verbreitete Erkrankung in der industrialisierten Welt. Leider ist man heute noch nicht in der Lage, diese Krankheit nicht-invasiv zu diagnostizieren, zudem sind die herkömmlichen Methoden unsicher, da nur Stenosestadien erkannt werden. Aufgrund der Gefährlichkeit von noch nicht stenotischen Gefäßveränderungen sind lumendarstellende Verfahren, wie z.B. die Angiographie zum Ausschluss eines klinischen Ereignisses nicht ausreichend. Viele Wissenschaftler beschäftigen sich deshalb seit geraumer Zeit mit der nicht-invasiven MRT-Technik. Da die Plaquezusammensetzung und nicht seine Größe für die Vulnerabilität entscheidend ist, wird an einem Verfahren zur Plaquedetektion und der Charakterisierung gearbeitet. MR-technologisch sind Wissenschaftler (FAYAD et al 2000b, FAYAD und FUSTER 2001a und b) bereits heute in der Lage, atherosklerotische Plaques mittels verschiedener Gewichtungen nicht-invasiv zu charakterisieren. Allerdings stellt sich neben dem großen technischen Aufwand dieses Verfahrens noch die Problematik der Bewegung des Herzens und Brustkorbes und damit der Auflösung.

Die Verwendung eines geeigneten MR-Kontrastmittels könnte der Detektion von atherosklerotischen Läsionen vor chirurgischen Eingriffen dienen; langfristig wäre die Therapiekontrolle bei Anwendung von Fettsenkern (Statinen) oder Diäten und Umstellung der Lebensgewohnheiten (Rauchen, Trinken, Sport etc.) denkbar. Ideal wäre ein MR-Kontrastmittel, welches Läsionen darstellt und gleichzeitig die Vulnerabilität charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden aufbauend auf den Arbeiten von BARKHAUSEN et al (2003) gadoliniumhaltige Verbindungen untersucht, die in der Lage sind, atherosklerotische Läsionen durch Anreicherung innerhalb der Läsionen im MRT durch Signalverstärkung zu detektieren. Die Anreicherung dieser Substanzen innerhalb der Plaques konnte per Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Daraus ergeben sich für die Zukunft neuartige diagnostische Möglichkeiten, die allerdings noch auf eine Plaquedetektion beschränkt sind und momentan keine Plaquecharakterisierung zur Einschätzung ihrer Vulnerabilität mit Hilfe von MRT zulassen.

Im Vergleich beider Kontrastmittel hat sich besonders Gadofluorine-M als geeignet gezeigt, atherosklerotische Läsionen im MRT durch signifikante Signalverstärkung in Plaques zu detektieren. Beide Substanzen reichert sich in jungen als auch älteren Plaques an, so dass sich alle Krankheitsformen signalreich darstellen ließen und somit alle Stadien atherosklerotischer Läsionen diagnostisch nachweisbar sind.

4.6 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Die paramagnetischen, gadoliniumhaltigen Substanzen Gadophrin-2 und Gadofluorine-M waren in vivo in der Lage, sich innerhalb atherosklerotischer Läsionen anzureichern. In gesunden Gefäßwandanteilen reichert sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte an. Aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften der Substanzen können zu bestimmten Untersuchungszeitpunkten atherosklerotische Läsionen deshalb durch Signalverstärkung im MRT detektiert werden.

Beide Kontrastmittel wurden mittels histologischer Serienschnitte unter anderem auf eine Kollokalisierung der Fluoreszenz und CD14-positiven Plaquebestandteilen untersucht, um die Hypothese einer zellulären Anreicherung mittels Makrophagen als phagozytierte Moleküle zu prüfen: Es konnte keine ausschließliche Kollokalisierung mit monozytären Zellen beobachtet werden, so dass diese Hypothese sich nicht bestätigte. Die Untersuchungen zeigen vielmehr, dass die Kontrastmittel intimal vorwiegend extrazellulär in der fettigen Matrix vorliegen. Bei Gadophrin-2 konnten häufig zusätzlich Kollokalisierungen mit Zellen vom MPS, insbesondere den Makrophagen, nachgewiesen werden. Bei Gadofluorine-M trat diese zusätzliche Kollokalisierung seltener auf und nahm mit der Zeit etwas zu. Die ausschließliche Anreicherung in MPS-zellreichen Plaquearealen konnte nur von Gadophrin-2 zum Untersuchungszeitpunkt 48 Stunden p.i. bei einem Drittel der

untersuchten Aortenbogenteilstücke beobachtet werden.

Im Zusammenhang der histologischen Untersuchungen erfolgte auch eine Charakterisierung der Plaquestadien, so dass die Ergebnisse der Signalgebung im MRT mit den Plaquestadien verglichen werden konnten: Beide Kontrastmittel sind grundsätzlich in der Lage, Plaques aller Stadien zu detektieren, sowohl junge, als auch fortgeschrittene Läsionen.

Im Versuch 2 wurde herausgefunden, dass das Anreicherungsverhalten von Gadophrin-2 in vitro bereits nach 5 Minuten qualitativ und quantitativ dem in vivo gleicht. Anders verhält sich Gadofluorine-M: Die Anreicherung in vitro erfolgt später als bei Gadophrin-2 und innerhalb der 120 Minuten Versuchsdauer nur im luminalen Drittel der Gefäßwandläsion. Das partikuläre SHU 555C konnte sich nicht innerhalb der Läsion anreichern, es ist auf zelluläre Mechanismen angewiesen (RUEHM et al 2001).

Weiterführende Untersuchungen zu den Anreicherungsmechanismen und Backup-Kandidaten für Gadofluorine-M finden derzeit durch die Schering AG Berlin statt. Insbesondere wird die Rolle von LDL bei der Anreicherung von Gadofluorine-M, die Vehikelfunktion von Gadofluorine-M als Schleppersubstanz und eine radioaktive Markierung zur genaueren Lokalisation im Gewebe untersucht.

Zur Etablierung eines In-vitro-Modells sollte für Untersuchungen mit Gadofluorine-M eine Methode entwickelt werden, die den Aortenringen Inkubationszeiten von 10 bis 24 Stunden ex vivo ermöglicht. Der in dieser Arbeit untersuchte Zeitraum war aus Gründen der Gewebsvitalität auf maximal 120 Minuten beschränkt worden, die für eine Anreicherung von Gadofluorine-M eventuell zu kurz war. Nach Methodenreifung könnte Gadofluorine-M oder seine Backup-Kandidaten in geringer Substanzmenge an isolierten menschlichen atherosklerotisch veränderten Blutgefäßen experimentell untersucht werden.